聚多巴胺磁分子印迹材料制备及其在食用油中 黄曲霉毒素 B 富集中的应用

胡美华1*、索莉莉2、董瑞婷1、杨银堂3、官吉军1

- (1. 南昌师范学院化学与食品科学学院,南昌 330032; 2. 传染病预防控制国家重点实验室研究基地, 江西省动物源与媒介生物性传染病重点实验室,南昌市疾病预防控制中心,南昌 330038;
 - 3. 江西联晟电子股份有限公司, 景德镇 333000)

摘 要:目的 建立了基于聚多巴胺磁性分子印迹聚合物吸附富集食用油中黄曲霉毒素 B 的方法。**方法** 以多巴胺为功能单体和交联剂,5,7-二甲氧基香豆素为模拟模板分子,一步法在 Fe_3O_4 NPs 表面制备磁分子印迹聚合物。采用透射电子显微镜和红外光谱仪对该分子印迹材料形态和结构进行表征,研究了其对两种黄曲霉毒素 B 吸附性能。最终以该印迹材料作为分散固相萃取剂,对影响黄曲霉毒素 B 吸附的条件进行了优化。**结果** 该分子印迹材料对两种黄曲霉毒素 B 的吸附模式符合 Langmuir 理论,对黄曲霉毒素 B_1 和黄曲霉毒素 B_2 最大吸附容量分别为 0.460 和 0.047 mg/g。在最佳萃取条件[材料用量(10 mg)、溶液 pH (7)、超声时间(5 min)和 1 mL(解吸 2 次,每次 0.5 mL) 3%乙酸/乙腈作为解析液]下,结合配有大体积流通池的超高效液相色谱-荧光检测法定量检测,黄曲霉毒素 B_1 和黄曲霉毒素 B_2 浓度分别在 $0.005\sim0.500$ ng/mL (r=0.9989)和 $0.001\sim0.100$ ng/mL (r=0.9992)范围内与对应的峰面积呈现良好的线性相关性,检出限分别为 0.0024 和 0.00038 ng/mL,食用油样品加标回收率为 $93.2\%\sim104.0\%$,相对标准偏差 $5.8\%\sim7.7\%$,且可重复使用至少 7 次。**结论** 该吸附富集方法具有快速、低廉、选择性高、稳定性好等特点,适用于食用油中黄曲霉毒素 B 的前处理。

关键词: 磁分子印迹材料; 5,7-二甲氧基香豆素; 黄曲霉毒素 B; 多巴胺; 食用油; 一步法

Preparation of polydopamine magnetic molecularly imprinted polymers for enrichment of aflatoxin B in edible oil

HU Mei-Hua^{1*}, SUO Li-Li², DONG Rui-Ting¹, YANG Yin-Tang³, GUAN Ji-Jun¹

(1. College of Chemistry and Food Science, Nanchang Normal University, Nanchang 330032, China; 2. The collaboration Unit for Field Epidemiology of State Key Laboratory for Infectious Prevention and Control, Jiangxi Provincial Key Laboratory of Animal-origin and Vector-bome Diseased, Nanchang Center for Disease Control and Prevention, Nanchang 330038, China; 3. Jiangxi Liansheng Electronic Co., Ltd., Jingdezhen 333000, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method for the extraction and enrichment of aflatoxin B in edible oil by the specific magnetic molecularly imprinted polymers. **Methods** Using dopamine as a functional monomer and cross-linker, and 5,7-dimethoxycoumarin as the dummy template, the molecularly imprinted polymers were

基金项目: 江西省科技厅项目(20192BBG70009)、南昌师范学院博士启动基金项目(NSBSJJ2020002)、江西省教育厅项目(GJJ202615)

Fund: Supported by Jiangxi Provincial Science and Technology Department Fund Project (20192BBG70009), the Doctoral Research Fund for Nanchang Normal University (NSBSJJ2020002), and the Jiangxi Province Education Commission Foundation (GJJ202615)

^{*}通信作者: 胡美华, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品分析。E-mail: cycle110@163.com

^{*}Corresponding author: HU Mei-Hua, Ph.D, Associate Professor, College of Chemistry and Food Science, Nanchang Normal University, No.889, Ruixiang Road, Economic and Technological Development Zone, Nanchang 330032, China. E-mail: cycle110@163.com

fabricated on the surface of ferroferric oxide nanoparticles by a one-pot method. The prepared molecularly imprinted polymers were characterized through a transmission electron microscopy and a Fourier transform infrared spectrometer. The adsorption properties towards two aflatoxin B were studied. The molecularly imprinted polymers were used as a sorbent for dispersive solid-phase extraction, the conditions affecting the adsorption of aflatoxin B were optimized. **Results** The adsorption properties of molecularly imprinted polymers to two aflatoxin B matched the Langmuir isotherm model, and the maximum adsorption capacities were 0.460 mg/g for aflatoxin B₁ and 0.047 mg/g for aflatoxin B₂. Under optimized conditions including molecularly imprinted polymers amount (10 mg), pH value 7, equilibrium time (5 min), and 1 mL (eluted twice, each 0.5 mL) 3% acetic acid/acetonitrile as desorption solvent, ultra performance liquid chromatography-fluorescence detection method with large volume flow cell was used for quantitative detection, the calibration plots were linear in the range of 0.005–0.500 ng/mL (r=0.9989) and 0.001–0.100 ng/mL (r=0.9992) with the limits of detection of 0.0024 and 0.00038 ng/mL for aflatoxin B₁ and aflatoxin B₂, respectively. The recoveries from spiked edible oil sample were 93.2%–104.0% with relative standard deviations of 5.8%–7.7%. And the molecularly imprinted polymers could be reused for 7 cycles. **Conclusion** The adsorption enrichment method has the characteristics of rapid, low cost, high selectivity and good stability, and is suitable for the pretreatment of aflatoxin B in edible oil.

KEY WORDS: magnetic molecularly imprinted polymers; 5,7-dimethoxycoumarin; aflatoxin B; dopamine; edible oil; one-step synthesis

0 引 言

黄曲霉毒素(aflatoxins, AFs)是由黄曲霉和寄生曲霉 等菌株产生的一类化学结构类似的真菌毒素[1], 其中, 黄 曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁)和黄曲霉毒素 B₂ (aflatoxin B₂, AFB₂)是主要的两种黄曲霉毒素, 广泛存在于霉变的花 生、玉米、食用油等农产品中[2-4]。食用油是人们日常烧菜 中必不可少的调料, 在加工和储藏过程中易受 AFs 的污染, 人们摄入了被 AFs 污染的食用油后, 会对人体产生较强的 肝毒性和致癌性^[5], 尤其以 AFB₁ 的毒性最强, 且不易通过 烹饪方式加以破坏。为此, 国际癌症研究机构将其列为 I 类致癌物[6-9], 我国在 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》中规定花生油和玉米油中 AFB1含 量不超过 20 μg/kg, 其他食用油不超过 10 μg/kg。尽管 AFB_2 是 AFB_1 的氢化衍生物, 其毒性也较强, 但我国还没 有对 AFB2 在食用油中含量作限制要求。因此, 为保障人们 舌尖上的安全, 加强对食用油中两种黄曲霉毒素 B 的监测 是非常重要的。

近些年来,高效液相色谱-荧光检测法因实验成本低、准确度高、灵敏度高等特点在国内外广泛应用于 AFB 检测^[10-12]。样品前处理方法的选择非常关键,不仅要求能有效去除基体干扰,还要求能将目标物富集,提高痕量组分分析的准确性和灵敏性。GB 5009.22—2016《食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》采用免疫亲和柱法(immunoaffinity column, IAC)对实际样品中 AFB 进行前处理,在一定程度上提高了 AFB 检测的灵敏度和选择性。然而,IAC 存在使用成本较高、无法重复使用^[13-14]等不足,导

致其实际应用受到了限制。因此,亟需开发一种环境友好、选择性高、成本低廉的前处理方法,以替代 IAC 用于 AFB 的吸附富集。

四氧化三铁纳米材料(Fe₃O₄ NPs)因毒性低、制备简 单、表面丰富的-OH 易于功能化等特点, 在食品安全领域 具有优良的应用潜力[15-16]。以 Fe₃O₄ NPs 作为磁核制备的 磁分子印迹聚合物一方面, 具有与模板分子在空间构型上 相类似的空腔, 能够高选择性吸附与模板分子结构类似的 化合物,与固相萃取剂相比,该材料有着更高的稳定性和 亲和力,可重复使用多次,节约了实验成本[17];另一方面, 具有超顺磁性, 在外加磁场作用下, 能够达到快速固-液分 离,无需烦琐的过滤或离心操作,提高了实验效率[18-19], 因而被广泛应用于复杂基质中目标物的分离和纯化[20-21]。 然而, 磁分子印迹材料的传统制备方法, 存在耗时长、实 验成本高、模板泄漏造成假阳性结果、因模板分子毒性大 给操作者健康带来危害等缺点[22-23],限制了其实际应用。 多巴胺(dopamine, DA)结构中含有-OH 和-NH2, 能够在弱 碱性条件下发生氧化自聚合作用, 在任何材料表面形成一 种亲水性和生物相容性良好的聚多巴胺膜(polydopamine, PDA)[24-26]。依据多巴胺这一特性制备分子印迹材料,克服 了传统制备过程耗时长、成本高的问题。近年来, 在分子 印迹材料制备中使用模拟模板分子越来越受到研究者的关 注, 既解决了模板泄漏造成假阳性问题, 又解决了因模板 分子毒性大给操作者带来健康问题。WYSZOMIRSKI等[27] 利用 5,7-二甲氧基香豆素(5,7-dimethoxycoumarin, DMC)具 有与 AFB 相类似结构, 且其毒性和价格均低于 AFB 的特 点,分别以DMC和AFB1作为模板分子制备了两种磁分子 印迹材料, 实验结果发现这两种材料对 AFB₁ 能实现相类似的萃取效果。

基于此,本研究以 Fe_3O_4 NPs 为磁核,DMC 为模拟模板分子,多巴胺既为功能单体又为交联剂,在 pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液中,一步法制备了磁分子印迹聚合物 (Fe_3O_4 @PDA MIPs)。以 Fe_3O_4 @PDA MIPs 为分散固相吸附剂,优化了萃取和富集条件,结合超高效液相色谱-荧光检测法(ultra performance liquid chromatography-florescence detection,UPLC-FLD),实现食用油样品中 AFB 含量的检测,以期为基层检测部门食用油中黄曲霉毒素 B 的快速检测提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 材料与试剂

Fe₃O₄ NPs(实验室前期已制备^[23]); 多巴胺盐酸盐、5,7-二甲氧基香豆素、盐酸、氢氧化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司); 三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl) methyl aminomethane, tris](纯度>99.8%,上海阿拉丁试剂科技股份有限公司); 甲醇、乙腈、乙酸(色谱纯,美国 Tedia试剂公司); 实验用水为超纯水(18.2 MΩ, 25°C,实验室自制); 标准品黄曲霉毒素 B_1 和 B_2 (纯度>99%)、黄曲霉毒素 G_1 (aflatoxin G_1 , AFG₁, 纯度>98.9%)(新加坡 Pribolab 公司); 玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)(102.2 μg/mL,澳大利亚Sigma-Aldrich 公司); 赭曲霉毒素 A (ochratoxin, OTA)(纯度 98.14%,美国 Stanford 化学试剂有限公司)。

AFB₁ 和 AFB₂ 标准储备液的配制: 准确称取 1.0 mg 两种标准物质分别于 100 mL 容量瓶中, 用乙腈溶解并定容至刻度, 摇匀, 得质量浓度为 $10.0 \, \mu g/mL$ 。

 AFB_1 和 AFB_2 混合标准中间液的配制: 分别准确吸取一定量上述标准储备液于容量瓶中, 用乙腈稀释至 10~mL, 摇匀, 分别得 AFB_1 100.0~ng/mL 和 AFB_2 20.0~ng/mL。

所有标准液均储存在-20℃的冰箱中。使用前自然恢 复至室温。

1.1.2 仪器与设备

H-Class 超高效液相色谱仪(配大体积流通池, 美国Waters 公司); JEM-2100 透射电子显微镜(日本 JEOL 公司); WQF-510A 傅里叶变换红外光谱仪(北京瑞利分析仪器公司); DP63C 真空干燥箱(日本 Yamato 公司); JJ-1 机械搅拌器(江苏常州润华电器有限公司); KQ-500DB 超声波(昆山市超声仪器有限公司); 2-16 KL 离心机(德国 Sigma 公司)。

1.2 液相色谱分析

本研究中色谱分离条件参照 GB/T 5009.22—2016, 稍做 改动。具体如下: 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C_{18} (100 mm ×2.1 mm, 1.7 μ m); 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 35°C; 激发波

长: 365 nm; 发射波长: 429 nm; 流动相: 乙腈(流动相 A)/水(流动相 B)/甲醇(流动相 C), 体积比为 16:68:16; 进样体积: $10~\mu$ L。

1.3 实验方法

1.3.1 磁性分子印迹材料的合成

Fe₃O₄@PDA MIPs 材料的制备通过多巴胺的自聚合反应得到^[23], 并略做修改。步骤如下: 称取 200 mg Fe₃O₄ NPs于三颈瓶中, 加入 80 mL tris-HCl缓冲溶液(10 mmol/L, pH 8.5), 室温下机械搅拌 1 h, 直至该磁性材料均匀分散;逐滴滴加 5 mL 0.5 mg/mL DMC(模拟模板分子)的乙腈溶液, 搅拌 2 h; 随后, 加入 100 mg 多巴胺盐酸盐,继续搅拌反应 6 h; 通过外加磁铁作用收集黑色沉淀。用 6%乙酸-60%甲醇(V:V)水溶液洗涤沉淀,直至 DMC 不被液相色谱检出为止,再用超纯水洗涤 3 次。最后,得到的 Fe₃O₄@PDA MIPs 在 45°C真空干燥 24 h。用作比较,除不添加模拟模板分子外,严格按照上述程序合成 Fe₃O₄ 磁性非分子印迹材料(Fe₃O₄@PDA NIPs)。

1.3.2 吸附性能试验

将 1 mg Fe₃O₄@PDA MIPs 分散于 10 mL 含不同初始 浓度 AFB 标准水溶液 $(0.02\sim5.00~\mu g/mL$ 的 AFB₁ 和 $0.002\sim0.500~\mu g/mL$ 的 AFB₂), 25° C超声萃取 5 min 后磁性分离。上清液以超液相色谱-荧光法检测 AFB,根据公式(1) 计算 Fe₃O₄@PDA MIPs 对两种 AFB 的吸附效率。采用 Langmuir^[28]和 Freumdlich^[29]吸附等温模式评价吸附剂的吸附性能,其公式分别为(2)和(3),拟合后得到公式(4)和(5)。

$$q_{\rm e} = (C_0 - C_{\rm e})V/(1000W) \tag{1}$$

$$q_{\rm e} = q_{\rm max}bC_{\rm e}/(1+bC_{\rm e}) \tag{2}$$

$$q_{\rm e} = K_{\rm f} C_{\rm e} 1/n \tag{3}$$

$$C_{\rm e}/q_{\rm e} = 1/(q_{\rm max}b) + C_{\rm e}/q_{\rm max}$$
 (4)

$$\lg q_{\rm e} = \lg k_{\rm f} + (1/n) \lg C_{\rm e} \tag{5}$$

其中: q_c : 平衡吸附容量(mg/g); q_{max} : 最大吸附容量(mg/g); C_0 : 初始质量浓度(mg/L); C_c : 平衡时被吸附物的质量浓度 (mg/L); V: 溶液体积(mL); W: 吸附剂的质量(g); b: Langmuir 常数; K_f 、n: Freumdlich 常数。

1.3.3 实际样品检测

食用油样品随机购置于南昌地区某超市,样品采集3份,每份样品平行测定5次。样品处理参照GB5009.22—2016执行。称取5.0g摇匀后的样品于50mL离心管中,加人20mL甲醇/水(70:30, V:V,下同)混合溶液,超声提取30min,离心;准确移取上清液1.0mL于顶空瓶中,40℃氮气流吹至近干,加人10mgFe₃O₄@PDAMIPs和10mL纯水,用0.1mol/LNaOH调节溶液pH为7.0;室温超声萃取5min后,在外加磁场作用下达到固-液分离;弃去上清液,往顶空瓶加入1mL(解析2次,每次0.5mL)3%乙酸/乙腈溶液进行解析。吸取0.16mL解析液于液相进样瓶中,再加入0.16mL甲醇和0.68mL超纯水,混匀,供超高效液相色谱仪分析。

1.4 数据处理

实验重复测定 5 次,以平均值±置信区间表示;所有实验数据均采用 Origin 8 软件进行制图。

2 结果与分析

2.1 Fe₃O₄@PDA MIPs 材料的制备和表征

本研究以 DMC 为模拟模板分子,利用弱碱性环境下 DA 在 Fe₃O₄ NPs 表面发生自聚合作用,制备得到磁性分子 印迹材料,制备过程如图 1。聚多巴胺结构中-NH₂、-OH 官能团和 DMC 结构中-O-和=O 官能团形成强的非共价键作用,将 DMC 固定在 Fe₃O₄ NPs 表面,形成分子印迹聚合物层;选用适当溶剂洗脱后,该聚合物材料表面形成了具有与 DMC 在大小、结构相类似的孔穴和结合位点,有利

于结构类似化合物 AFB 通过氢键和 π-π 键作用吸附在分子 印迹材料表面,实现与杂质分离的目的。

图 2A 为以 KBr 压片获得的 Fe_3O_4 NPs、 Fe_3O_4 @PDA MIPs 和 DA 的红外光谱图。 Fe_3O_4 NPs 中官能团—OH 和 Fe-O 的特征吸收峰为 3430 与 593 cm $^{-1}$ (图 2Aa)。经聚多巴胺包裹后的 Fe_3O_4 @PDA MIPs 在 1619 cm $^{-1}$ 处出现了新的吸收峰(图 2Ab),这归因于 DA 芳香环中-C=C-官能团的伸缩振动(图 2Ac),表明 Fe_3O_4 NPs 表面成功包裹着一层 PDA。采用透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)对 Fe_3O_4 NPs 和 Fe_3O_4 @PDA MIPs 进行形貌表征(图 2B)。图 2Ba 为 Fe_3O_4 NPs 的 TEM 图,分散良好,粒径均一,直径大约为 252 nm。由图 2Bb 可以看出, Fe_3O_4 NPs 表面被一层灰色聚多巴胺包裹,厚度约为 12 nm。这进一步证明了核-壳结构的 Fe_3O_4 @PDA MIPs 成功制备。

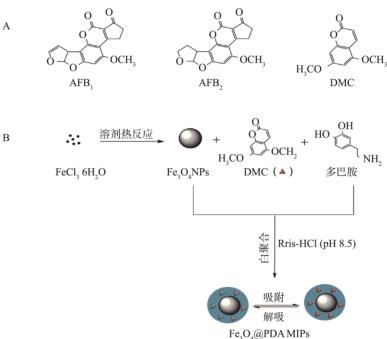
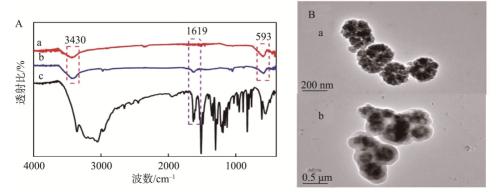


图 1 AFB₁、AFB₂和 DMC 的结构式(A)和 Fe₃O₄@PDA MIPs 制备过程(B) Fig.1 Structures of AFB₁, AFB₂ and DMC (A) and schematic procedure of Fe₃O₄@PDA MIPs (B)



注: A 图中 a 为 Fe₃O₄ NPs, b 为 Fe₃O₄@PDA MIPs, c 为 DA; B 图中 a 为 Fe₃O₄ NPs, b 为 Fe₃O₄@PDA MIPs。 图 2 材料的红外光谱图(A)与透射电镜图(B)

Fig.2 Infrared spectra (A) and transmission electron microscopy graphs (B) of the materials

2.2 萃取条件的优化

2.2.1 超声时间对萃取效率的影响

本研究考察了超声时间为 1~20 min 范围时, Fe₃O₄@PDA MIPs 材料对两种 AFB 萃取效率情况。由图 3 可知, 超声时间为 1~5 min 时, 该印迹材料对 AFB₁ 和 AFB₂ 萃取效率均表现为增大趋势, 最大回收率分别为 62.8%和 53.4%, 当继续延长超声萃取时间时, 萃取效率并未有明显变化。因此, 超声萃取时间选择 5 min 作为后续实验的最佳条件。

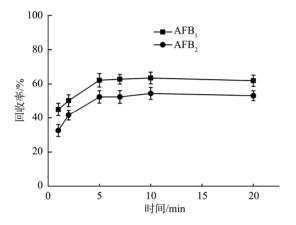


图 3 超声时间对萃取效率的影响

Fig.3 Effects of the ultrasonic time on extraction efficiency

2.2.2 pH 对萃取效率的影响

重点研究了溶液 pH 在 $2\sim11$ 时 Fe_3O_4 @PDA MIPs 对 两种黄曲霉毒素 B 的萃取效率,结果如图 4 所示。当溶液 pH 为 $2\sim7$ 时,该印迹材料对 AFB 的萃取效率明显增大。 AFB₁ 回收率从 34.0%增加到 75.1%; AFB₂ 回收率从 26.7%增加为 63.8%。然而,随着溶液酸度继续下降,其萃取效率逐渐降低,甚至在 pH 为 11 时,回收率仅有 2.0%左右。这是因为 AFB₁ 的 pKa 为 $17.79^{[30]}$,存在于中性溶液中,溶液的酸碱性可能影响着 Fe_3O_4 @PDA MIPs 对 AFB₁ 的吸附效率;考虑到 AFB₂ 是 AFB₁ 的氢化衍生物,溶液酸碱性对 AFB₂影响与 AFB₁相同。为此,本研究选择溶液 pH 为 7。

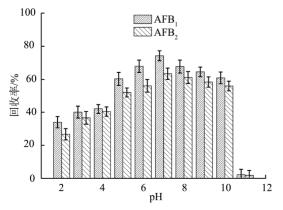


图 4 pH 对萃取效率的影响 Fig.4 Effects of pH on extraction efficiency

2.2.3 Fe₃O₄@PDA MIPs 量对萃取效率的影响

考察了 Fe_3O_4 @PDA MIPs 用量在 $2\sim30$ mg 范围内对 AFB₁ 和 AFB₂ 萃取效率的影响。由图 5 可见,当 Fe_3O_4 @PDA MIPs 的使用量从 2 mg 增大到 6 mg 时,该材料对 AFB₁ 吸附效率呈现增大趋势,回收率由 62.8%增加到 76.3%,随着材料的用量继续增加,对 AFB₁ 吸附效率未有显著变化;对于 AFB₂, Fe_3O_4 @PDA MIPs 用量在 $2\sim10$ mg 之间,吸附效率明显提高,然而,继续增加吸附材料到 30 mg 时,萃取回收率基本无改变。综合考虑,本研究选择 10 mg 作为 Fe_3O_4 @PDA MIPs 最大使用量。

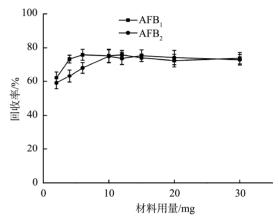


图 5 Fe₃O₄@PDA MIPs 量对萃取效率的影响 Fig.5 Effects of the amount of Fe₃O₄@PDA MIPs on extraction efficiency

2.2.4 解析溶剂对解析效率的影响

本研究考察了甲醇、乙腈、1%乙酸/乙腈和 3%乙酸/乙腈 4 种溶剂对吸附在印迹材料中两种 AFB 的解析效果。由图 6A 可知,甲醇的解析效果最差,3%乙酸/乙腈为解析剂时解析效果最佳,回收率为 AFB₁ 90.1%和 AFB₂ 82.7%。与此同时,还考察了解析剂用量对解析效率的影响,如图 6B。实验结果表明,采用 1 mL(解吸 2 次,每次 0.5 mL) 3%乙酸/乙腈对材料中 AFB₁ 和 AFB₂ 进行解析时,回收率分别为 102.1%和 92.4%。因此,本研究选择 1 mL(解吸 2 次,每次 0.5 mL) 3%乙酸/乙腈作为最佳解析条件。

综上所述,本研究以 Fe_3O_4 @PDA MIPs 为分散固相萃取剂,优化得到最佳萃取参数为:超声萃取时间为 5 min, pH 为 7, Fe_3O_4 @PDA MIPs 为 10 mg,解析液为 1 mL(解吸2次,每次 0.5 mL) 3%乙酸/乙腈。作为比较,在上述实验条件下,考察了 Fe_3O_4 @PDA MNIPs 对 AFB 的吸附情况。结果显示, Fe_3O_4 @PDA MNIPs 对 AFB₁和 AFB₂的萃取回收率分别为 40.8%和 38.4%,萃取效率明显低于 Fe_3O_4 @PDA MIPs,可能归因于非分子印迹材料未有与 Fe_3O_4 @PDA MIPs,可能归因于非分子印迹材料未有与 Fe_3O_4 0。2 mg/mL AFB₁和 0.04 ng/mL AFB₂)萃取后的标准液相色谱图。与直接进样获得的标准色谱图(图 7a)相比,经 Fe_3O_4 @PDA MIPs 萃

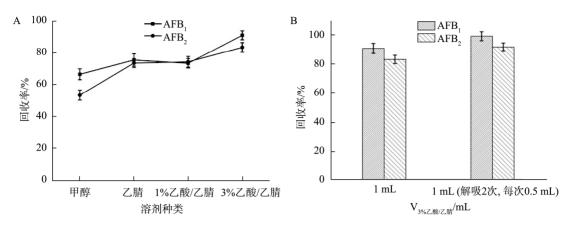
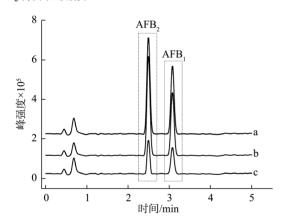


图 6 解吸液及用量对解析效率的影响

Fig.6 Effects of desorption solution and dosage on desorption efficiency

取后两种 AFB 标准色谱图(图 7b)的峰形对称, 且保留时间和峰面积几乎一致。然而, 经 Fe_3O_4 @PDA MNIPs 萃取得到的标准峰面积(图 7c)显著低于直接进样方式。这表明 Fe_3O_4 @PDA MIPs 印迹空腔的形成, 展示出对 AFB₁ 和 AFB₂ 特异性吸附。



注: a 为直接进样, b 为 Fe₃O₄@PDA MIPs, c 为 Fe₃O₄@PDA MNIPs; 0.2 ng/mL AFB₁ 和 0.04 ng/mL AFB₂。

图 7 不同吸附材料中 AFB 标准色谱图 Fig.7 Standard chromatograms of AFB in different adsorption materials

2.3 Fe₃O₄@PDA MIPs 材料的稳定性

为了评价 Fe₃O₄@PDA MIPs 对目标物吸附的稳定性, 将该 MIPs 连续进行吸附-洗脱-吸附重复测试,要求在下一 次吸附前均采取 10 mL 乙腈活化(活化 2 次,每次 5 mL)。 实验结果发现连续 7 次循环使用后,该材料对两种 AFB 的 吸附能力未有明显下降趋势,回收率均稳定在 90.1%左右, 说明制备的 Fe₃O₄@PDA MIPs 具有良好的稳定性,可重复 使用多次,节约了实验成本。

2.4 吸附等温模式

为了深入评价 Fe₃O₄@PDA MIPs 对目标物的吸附机

制,本研究采用 Langmuir 和 Freundlich 吸附等温模式进行研究。表 1 为实验数据经公式(4)和(5)计算结果。由表 1 可知, Langmuir 等温方程式拟合得到的相关系数 r^2 均超过0.996, 明显优于 Freundlich 等温模式(AFB₁ 的 r^2 为 0.790和 AFB₂的 r^2 为 0.750),这阐明了 Fe₃O₄@PDA MIPs 对 AFB 吸附方式符合 Langmuir 模式(即 Fe₃O₄@PDA MIPs 通过单分子层的形态将目标物吸附在其表面),最大吸附容量 (q_{max}) AFB₁ 为 0.460 mg/g 和 AFB₂ 为 0.047 mg/g。

表 1 等温吸附模式参数 Table 1 Isothermal adsorption mode parameters

化合物	Lang	Freundlich 方程				
	$q_{\rm max}/({ m mg/g})$	b/(L/mg)	r^2	K_{f}	n	r^2
AFB ₁	0.460	21.320	0.996	0.45	2.69	0.790
AFB ₂	0.047	614.84	0.998	0.13	2.37	0.750

2.5 共存物的影响

本研究选取食用油中 AFG₁、OTA 和 ZEN 3 种常见真菌毒素为共存化合物模型,考察各共存物存在下,该 MIPs 对两种 AFB 吸附选择性。在 AFB 混合溶液(AFB₁ 0.05 ng/mL 和 AFB₂ 0.01 ng/mL)中,分别加入上述单一共存物,在最优实验条件下萃取,以 UPLC-FLD 定量检测。实验结果显示,在各共存物存在时,对两种 AFB 萃取效率无明显影响,萃取回收率均在 82.1%~103.8%之间,且保留时间附近无干扰峰出现,表明各共存物存在均不干扰Fe₃O₄@PDA MIPs 对两种 AFB 的萃取和检测,说明Fe₃O₄@PDA MIPs 材料对目标物 AFB 有较高的选择性和抗干扰能力。

2.6 方法学评价

称取 10 mg Fe₃O₄@PDA MIPs 于顶空瓶中,加人 10 mL (AFB₁ 0.005~0.500 ng/mL 和 AFB₂ 0.001~0.100 ng/mL)标

准水溶液,在最佳实验条件萃取,超高效液相色谱-荧光法定量检测。以目标物的浓度为横坐标(X, ng/mL),对应的峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得到线性回归方程AFB₁为 Y_1 =5.7×10⁵ X_1 +9.8×10³和AFB₂为 Y_2 =3.0×10⁶ X_2 +1.6×10⁴,相关系数r分别为 0.9989 和 0.9992,最低检出限分别为 0.0024 和 0.00038 ng/mL,低于我国国家标准方法(GB 5009.22—2016)的检出限(AFB₁为 0.02 ng/mL 和 AFB₂为 0.003 ng/mL)10 倍左右。

向食用油样品中添加 3 个水平的标准溶液(即 AFB₁ 为 0.01、0.05、0.20 ng/mL 和 AFB₂ 为 0.002、0.010、0.040 ng/mL) 进行加标回收实验。表 2 结果说明, Fe_3O_4 @PDA MIPs 对两种 AFB 的加标回收率为 $93.2\%\sim104.0\%$,相对标准偏差在 $5.8\%\sim7.7\%$ 之间(n=5),阐明该分子印迹材料可以很好萃取和富集两种 AFB。同时,与文献[31]报道的使用 DMC 作为模拟模板制备的分子印迹相比,该方法的样品加标回收率

更高, 提高了样品检测的准确度。

3 结论

本研究以 Fe₃O₄ NPs 为磁核, DMC 为模拟模板分子, 基于多巴胺在室温条件下自聚合反应, 一步法制备对 AFB 有特异选择吸附的磁性分子印迹聚合物, 结合配有大体积流通池的 UPLC-FLD法, 实现了对食用油中 AFB 的定量分析。与传统分子印迹材料相比^[22], 该分子印迹材料的制备克服了合成过程苛刻、试剂种类多、因模板泄漏而引起假阳性结果和给操作者带来健康危害等缺点。其次, 该印迹材料具有超顺磁性, 无需离心或过滤操作, 且可重复使用至少 7 次, 节约实验时间和成本。本研究建立的方法具有检出限低、回收率高、检测速度快等优点, 可为食用油中AFB 的定量检测提供新的科学数据。

表 2 食用油样品中 AFB 加标回收率 Table 2 Recoveries of AFB in spiked edible oil

加标质量浓度/(ng/mL)		测得质量浓度/(ng/mL)		回收率(相对标准偏差)/%		
AFB ₁	AFB_2	AFB ₁	AFB_2	AFB_1	AFB_2	
0	0	ND	ND			
0.01	0.002	0.0102	0.00207	102.0±6.7 (5.8)	103.5±6.8 (7.7)	
0.05	0.01	0.0486	0.0104	97.2±7.2 (6.3)	104.0±6.4 (5.6)	
0.20	0.04	0.1936	0.0373	96.8±7.1 (7.2)	93.2±7.5 (6.5)	
	AFB ₁ 0 0.01 0.05	AFB ₁ AFB ₂ 0 0 0.01 0.002 0.05 0.01	AFB ₁ AFB ₂ AFB ₁ 0 0 ND 0.01 0.002 0.0102 0.05 0.01 0.0486	AFB ₁ AFB ₂ AFB ₁ AFB ₂ 0 0 ND ND 0.01 0.002 0.0102 0.00207 0.05 0.01 0.0486 0.0104	$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	

注: ND 表示未检出。

参考文献

- [1] 郝铖, 王思齐, 李腾飞, 等. 分子印迹技术在黄曲霉毒素检测中的最新研究进展[J]. 分析试验室, 2022, 41(3): 350-356.
 - HAO C, WANG SQ, LI TF, *et al*. Recent research advances in aflatoxin detection by molecular imprinting technique [J]. Chin J Anal Lab, 2022, 41(3): 350–356.
- [2] ZHAO GY, OUYANG XK, YANG LY, et al. Facile fabrication of surface molecularly imprinted magnetic polydopamine for selective adsorption of fluoroquinolone from aqueous solutions [J]. J Mol Struct, 2021, 1243: 130894.
- [3] MANIZAN AL, OPLATOWSKA-STACHOWIAK M, PIRO-METAYER I, et al. Multi-mycotoxin determination in rice, maize and peanut products most consumed in Côte d'Ivoire by UHPLC-MS/MS [J]. Food Control, 2018, 87: 22–30.
- [4] 董文亚, 陈晨, 赵秀兰, 等. 山东省市售花生及其制品中黄曲霉毒素 B₁ 污染 状况分析与膳食暴露评估[J]. 中国油脂, 2022. https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1099.TS.20220623.1924.010.html DONG WY, CHEN C, ZHAO XL, *et al.* Contamination status analysis and dietary exposure assessment of aflatoxin B₁ in peanut and its products sold in Shandong province [J]. China Oil Fat, 2022. https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1099.TS.20220623.1924.010.html

- [5] LI SQ, ZHONG XY, XU YN, et al. Smartphone-based reading system integrated with phycocyanin-enhanced latex nanospheres immunoassay for on-site determination of aflatoxin B₁ in foodstuffs [J]. Food Chem, 2021, 360: 130019.
- [6] XIANG XR, YE QH, SHANG YT, et al. Quantitative detection of aflatoxin B₁ using quantum dots-based immunoassay in a recyclable gravity-driven microfluidic chip [J]. Biosens Bioelectron, 2021, 190: 113304
- [7] LI SQ, ZHONG XY, XU YA, et al. Smartphone-based reading system integrated with phycocyanin-enhanced latex nanospheres immunoassay for on-site determination of aflatoxin B₁ in foodstuffs [J]. Food Chem, 2021, 360: 130019.
- [8] 韩冰, 贾永梅, 李志果, 等. 核酸适配体传感器在黄曲霉毒素 B₁ 检测中应用研究进展[J]. 分析科学学报, 2022, 38(3): 371–376.
 HAN B, JIA YM, LI ZG, et al. Research progress of aptasensors in detecting aflatoxin B₁ [J]. J Anal Sci, 2022, 38(3): 371–376.
- [9] HE TT, ZHOU T, WAN YQ, et al. A simple strategy based on deep eutectic solvent for determination of aflatoxins in rice samples [J]. Food Anal Methods, 2020, 13: 542–550.
- [10] 李莜, 黄丽珍, 曾永芳. 高效液相色谱—柱后衍生法测定黄曲霉毒素的方法改进[J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32(4): 422–424, 429. LI Y, HUANG LZ, ZENG YF. An improved method for the determination

- of aflatoxins by high performance liquid chromatography and post-column derivatization [J]. Chin J Health Lab Technol, 2022, 32(4): 422–424, 429.
- [11] ALILOU S, AMIRZEHNI M, ESLAMI PA. A simple fluorometric method for rapid screening of aflatoxins after their extraction by magnetic MOF-808/graphene oxide composite and their discrimination by HPLC [J]. Talanta, 2021, 235: 122709.
- [12] FEIZY J, ES'HAGHI Z, LAKSHMIPATHY R. Aflatoxins' clean-up in food samples by grapheme oxide-polyvinyl poly pyrrolidone-hollow fiber solid-phase microextraction [J]. Chromatographia, 2020, 83: 385.
- [13] 宋立新,梁雨涛,张云霞,等. 槲皮素分子印迹聚合物的制备及其在处理粮食黄曲霉毒素中的应用[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2021, 42(5): 110-116.
 - SONG LX, LIANG YT, ZHANG YX, et al. Preparation and application of quercetin molecularly imprinted polymers in the treatment of aflatoxins in grains [J]. J Henan Univ Technol (Nat Sci Ed), 2021, 42(5): 110–116.
- [14] 刘明珠, 成亚倩, 王永辉, 等. 免疫磁性微球预处理结合超高效液相色谱-串联质谱法快速检测花生和花生油中黄曲霉毒素 B₁[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(2): 443–448.

 LIU MZ, CHENG YQ, WANG YH, *et al.* Rapid determination of aflatoxin B₁ in peanut and peanut oil by an immunomagnetic beads purification
 - B₁ in peanut and peanut oil by an immunomagnetic beads purification sample pretreatment method combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(2): 443–448.
- [15] NADALI A, LEILI M, AFKHAMI A, et al. Synthesize and application of magnetic molecularly imprinted polymers (mag-MIPs) to extract 1-aminopyrene from the human urine sample [J]. J Environ Chem Eng, 2021, 9: 106253.
- [16] ARABI M, OSTOVAN A, BAGHERI AR, et al. Strategies of molecular imprinting-based solid-phase extraction prior to chromatographic analysis [J]. TrAC-Trend Anal Chem, 2020, 128: 115923.
- [17] 张鑫, 李彦松, 汤波, 等. 磁性分子印迹微球的制备及其对熊果酸的选择性分离[J]. 分析化学, 2021, 49(4): 628-635.

 ZHANG X, LI YS, TANG B, *et al.* Preparation of magnetic molecularly
 - imprinted microspheres for selective separation of ursolic acid [J]. Chin J Anal Chem, 2021, 49(4): 628–635.
- [18] HUANG SY, XU JQ, ZHENG JT, et al. Synthesis and application of magnetic molecularly imprinted polymers in sample preparation [J]. Anal Bioanal Chem, 2018, 410: 3991.
- [19] 曹玉天,盛万里,齐小花,等.聚乙二醇修饰的槲皮素磁性分子印迹聚 合物合成及其应用[J].分析科学学报,2021,37(6):719-725.
 - CAO YT, SHENG WL, QI XH, *et al.* Synthesis and application of magnetic molecularly imprinted polymers of PEG modified quercetin [J]. J Anal Sci, 2021, 37(6): 719–725.
- [20] TEIXEIRA RA, DINALI LAF, DE-OLIVEIRA HL, et al. Efficient and selective extraction of azamethiphos and chlorpyrifos residues from mineral water and grape samples using magnetic mesoporous molecularly imprinted polymer [J]. Food Chem, 2021, 361: 130116.
- [21] CUI YH, DING L, DING J. Recent advances of magnetic molecularly

- imprinted materials: From materials design to complex sample pretreatment [J]. TrAC-Trend Anal Chem, 2022, 147: 116574.
- [22] 谈晓佩, 李珊珊, 石海珠, 等. 萘乙酸多孔磁性分子印迹聚合物微球的 制备[J]. 分析测试学报, 2021, 40(12): 1790–1795.

 TAN XP, LI SS, SHI HZ, et al. Preparation of porous magnetic

molecularly imprinted polymer microspheres for accurately recognizing *a*–naphthylacetic [J]. J Instrum Anal, 2021, 40(12): 1790–1795.

- [23] HU MH, GE W, LIU XJ, et al. Preconcentration and determination of zearalenone in corn oil by a one-step prepared polydopamine-based magnetic molecularly imprinted polymer (MIP) with high-performance liquid chromatography with fluorescence (HPLCFLD) detection [J]. Anal Lett. 2022. 55: 343–354.
- [24] 刘浩, 欧阳敬禹, 刘恋, 等. 一种制备唾液酸酸性表面分子印迹聚合物的新方法[J]. 化学试剂, 2022, 44(1): 73-79.
 LIU H, OUYANG JY, LIU L, et al. A novel method for preparing of sialic acid magnetic surface molecularly imprinted polymer [J]. Chem Reag, 2022, 44(1): 73-79.
- [25] MIAO JN, LIU AR, WU LN, et al. Magnetic ferroferric oxide and polydopamine molecularly imprinted polymer nanocomposites based electrochemical impedance sensor for the selective separation and sensitive determination of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) [J]. Anal Chim Acta, 2020, 1095: 82–92.
- [26] CHEN W, FU M, ZHU XX, et al. Protein recognition by polydopaminebased molecularly imprinted hollow spheres [J]. Biosens Bioelectron, 2019, 142: 111492.
- [27] WYSZOMIRSKI M, PRUS W. Molecular modelling of a template substitute and monomers used in molecular imprinting for aflatoxin B_1 micro-HPLC analysis [J]. Mol Simulat, 2012, 38: 892–895.
- [28] LANGMUIR I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum [J]. J Am Chem Soc, 1918, 40: 1361–403.
- [29] FREUNDLICH H. Über die adsorption in lösungen [J]. Z Phys Chem, 1907, 57U 1: 385–470.
- [30] LI Y, TIAN GY, GONG LL, et al. Evaluation of natural sepiolite clay as adsorbents for aflatoxin B₁: A comparative study [J]. J Environ Chem Eng, 2020, 8: 104052.
- [31] LIANG GH, ZHAI HY, HUANG L, et al. Synthesis of carbon quantum dots-doped dummy molecularly imprinted polymer monolithic column for selective enrichment and analysis of aflatoxin B₁ in peanut [J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 2018, 149: 258–264.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介



胡美华,博士,副教授,主要研究方向 为食品分析。

E-mail: cycle110@163.com